

Foto: Patrícia Flores

COMUNICADO
TÉCNICO

205

Brasília, DF
Dezembro, 2018

Embrapa

Protocolo para conservação in vitro por crescimento lento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

Patrícia Silva Flores
Rosa de Belem das Neves Alves
Luciene Dionízio Cardoso

Protocolo para conservação in vitro por crescimento lento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

¹ Patrícia Silva Flores – Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Rosa de Belem das Neves Alves – Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;
Luciene Dionízio Cardoso - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A fáfia ou ginseng-brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) é uma planta arbustiva com propriedades medicinais que ocorre no sul da América tropical e subtropical. Suas raízes são utilizadas na medicina popular brasileira, especialmente como tônico, afrodisíaco e no controle do diabetes. Ainda, com base em dados etnobotânicos, Silva Júnior e Osaida (2005), destacam as seguintes propriedades:

(...) as raízes e folhas da planta têm sido utilizadas como estimulantes gerais, tranqüilizantes, anti-reumáticas, antidiarréicas, antiinflamatórias, antidiabéticas, febrifugas, cicatrizantes internas e externas, anti-hemorroidicas, melhoria da visão e da memória e para o tratamento de distúrbios gástricos, artrite, artrose, anemia, astenia e dores.

Na região de maior ocorrência natural de *P. glomerata* no país, localizada no Paraná, frequentemente, os agricultores familiares complementam sua renda com a coleta extrativista do ginseng-brasileiro. Esta atividade associada à intensa exploração agrícola e pecuária da região tem reduzido a regeneração natural da espécie (Corrêa-Júnior et al., 2016). Este fato, aliado à crescente demanda comercial da espécie, notabiliza

a necessidade do desenvolvimento de métodos de conservação eficientes que possam garantir a variabilidade da espécie e minimizar os riscos de extinção.

Apesar de estudos sinalizarem que a espécie produz sementes do tipo ortodoxa (Alves et al., 2006), a conservação de germoplasma por sementes em câmara fria tem sido dificultada pela baixa produção de sementes viáveis. Em 2001, a Universidade Estadual Paulista - Unesp de Botucatu, SP, a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Paraná - Emater-PR e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, em um esforço conjunto para conservar a variabilidade genética de *Pfaffia glomerata*, realizaram uma coleta de germoplasma de populações naturais na principal região de ocorrência da espécie, localizada na divisa entre os estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. Em 2004 e em 2006, novos acessos foram coletados em São Paulo e em Mato Grosso, em áreas que ainda não haviam sido amostradas. O material coletado foi incorporado a uma coleção de germoplasma in vitro depositada no Banco Genético localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A coleção tem sido mantida com sucesso pela técnica de crescimento reduzido,

cujo princípio consiste em minimizar o metabolismo da planta, aumentando assim a sua longevidade, sem afetar sua viabilidade ou sem que ocorram mudanças genéticas nas células. Dessa forma, o intervalo entre as transferências das plantas para o novo meio de cultura tem sido prolongado, aumentando deste modo o tempo de armazenamento e reduzindo a demanda de trabalho e custo para a sua manutenção.

A redução no crescimento é alcançada pela redução da intensidade de luz ou temperatura de incubação, ou e/ou por meio da suplementação do meio de cultura com agentes osmóticos, retardantes de crescimento, inibidores da síntese de etileno ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio. Normalmente, tem-se adotado uma combinação de duas ou mais estratégias para a conservação por crescimento reduzido.

Este método de conservação *in vitro* apresenta a vantagem de ser um método que possibilita a rápida retomada da capacidade de multiplicação, agilizando a propagação clonal dos materiais, quando necessária.

O objetivo desta publicação é descrever o protocolo utilizado para a conservação *in vitro* por crescimento lento de segmentos nodais de fáfia, com base nos estudos realizados no Laboratório de Conservação *In Vitro* do Banco Genético da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

Obtenção do material vegetal a ser conservado

O material vegetal deve ser proveniente de segmentos caulinares. Os segmentos podem ser coletados de plantas matrizes diretamente do campo ou de plantas estabelecidas a partir da estaquia, em casa de vegetação. No primeiro caso, recomenda-se que a coleta seja feita nos meses mais secos, desde que fornecido o suprimento adequado de água às plantas, para reduzir o índice de contaminação *in vitro*. É importante salientar também, que deverão ser retirados os propágulos vegetativos de plantas matrizes livres de pragas e doenças. No caso de serem utilizadas plantas provenientes da estaquia, devem ser retiradas estacas de 10 cm de comprimento das porções medianas e basal dos ramos por estas apresentarem maior capacidade de brotamento (Nicoloso et al., 1999; Nicoloso et al., 2001). O substrato utilizado pode ser composto por uma mistura de 1:1 de casca de arroz carbonizado + solo adubado com NPK -5:20:20 (2,0 kg por m³ de solo) e com 15% de matéria orgânica.

Preparo de meio de cultura, desinfestação e inoculação dos explantes de segmentos nodais de fáfia

O meio de cultura utilizado é o MS (Tabela 1), (Murashige; Skoog, 1962) devendo ser preparado com 3% de sacarose e gelificado com 0,2% de Phytigel® e pH ajustado para 5,7 (Tabela 1). Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em tubos de ensaio 20 x 150 mm (10 mL/tubo), vedados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos a 1,1 Kgf.cm⁻², em temperatura de 121°C

Tabela 1. Componentes do meio de cultura básico de Murashige & Skoog (Murashige; Skoog, 1962)

Concentração	mg.L ⁻¹	Componentes mM
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	1.650,00	20,60
KNO ₃	1.900,00	18,80
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00	3,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	1,50
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25
Micronutrientes		
MgSO ₄ .7H ₂ O	22,30	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	0,030
H ₃ BO ₃	6,20	0,100
KL	0,83	0,0005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,0001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0001
FeEDTA		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	0,10
Vitaminas		
Tiamina - HCl	0,10	0,0003
Piridoxina - HCl	0,50	0,0024
Ácido nicotínico	0,50	0,0040

Concentração	mg.L-1	Componentes mM
Suplementos		
Glicina	2,00	0,0270
Mio-Inositol	100,00	0,05
MSacarose	30.000,00	87,60

Para obtenção de segmentos nodais a partir de plantas provenientes do campo, é recomendável o pré-tratamento dos segmentos do caule da planta em solução fungicida antes da assepsia. Para tanto, as folhas são removidas e os caules segmentados em secções de 3 cm. Os segmentos deverão ser tratados com fungicida de contato. Pode ser utilizado o fungicida Cercobin® 700 PM (Dimethyl 4,4'-(o-phenylene) bis (3-thioallophanate) tiofanato-metilico na concentração de 2 g.L⁻¹ em água destilada. O material deve ser submerso nesta solução por uma hora, sob agitação, e posteriormente lavados em água destilada para a remoção do fungicida. Em câmara de fluxo laminar, o material deve ser imerso em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto, e em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo em água destilada) por 20 minutos. Após a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, os explantes são segmentados com auxílio de um bisturi em secções caulinares com cerca de dois centímetro, contendo duas gemas, sendo em seguida inoculados na posição horizontal com auxílio de pinça individualmente nos tubos de ensaio contendo meio de cultura.

Os tubos de ensaio devem ser mantidos por 30 dias em sala de crescimento a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas, provido por lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*), com intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

Preparo de meio de cultura de conservação, excisão e transferência de segmentos nodais.

O meio de conservação por crescimento lento para segmentos nodais deverá ser preparado com a metade da concentração de macro e micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 4% de sorbitol e gelificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 (Alves et al., 2010).

Em seguida, o meio de cultura deve ser distribuído em tubos de ensaio de 35 x 127 mm (15 mL/tubo), vedados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos a 1,1Kgf.cm⁻², em temperatura de 121°C.

Os explantes utilizados para conservação deverão ser compostos de

segmentos apicais, pois estes apresentam maior sobrevivência no meio de conservação. Os segmentos, com cerca de 2 cm de comprimento contendo a gema apical e dois pares de gemas laterais deverão ser excisados de plântulas assépticas de 30 dias de idade, com auxílio de pinça e bisturi e inoculados diretamente nos tubos de ensaio na posição vertical (um segmento/tubo de ensaio) (Figura 1).

Foto: Patrícia Flores



Figura 1. Explante de segmento apical caulinar de fáfia utilizado para a conservação in vitro por crescimento reduzido.

Os tubos devem ser mantidos em sala de crescimento a 25°C, sob as mesmas condições descritas anteriormente, até que a planta apresente crescimento radicular e vegetativo para então serem transferidas para câmara de conservação à 10°C, sob fotoperíodo de 12 horas, provido por lâmpadas LED com intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Com esta metodologia, a fáfia pode ser mantida no meio de conservação por dois anos.

Controle de qualidade

Durante o período de conservação, as plantas devem ser monitoradas a cada seis meses. Devem ser registradas a ocorrência de contaminações, o vigor da planta, a ocorrência de distúrbios fisiológicos que afetam a conservação in vitro e a necessidade de repicagem. O vigor da planta é definido por meio de uma escala baseando-se no estágio de senescência da planta conforme ilustrado na figura 2. A renovação da cultura deve ser efetuada quando a planta apresentar o estado regular.

Foto: Patrícia Flores

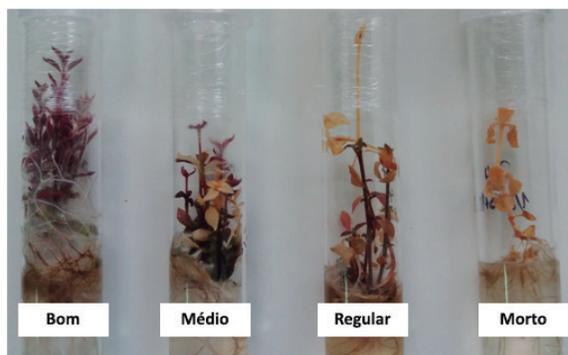


Figura 2. Estádios da senescência em aceso de fáfia conservada in vitro por crescimento reduzido. (Bom estado - folhas e brotos totalmente verdes ou iniciando o secamento e morte das folhas; Estado médio - secamento e morte das folhas e dos brotos entre 30 e 50%; Estado Regular - mais de 50% de secamento e morte de folhas e brotos; Morto - folhas e brotos mortos).

Para renovar a coleção, os ápices viáveis e segmentos caulinares contendo uma gema, devem ser seccionados e transferidos para o meio de conservação. Caso o vigor das plantas esteja muito baixo, os explantes deverão ser transferidos provisoriamente, para um meio de multiplicação composto de sais MS suplementado com 3% de sacarose e 0,2% de Phytigel®. Durante a fase de renovação, as culturas devem ser incubadas à 25°C, sob intensidade luminosa de 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, até que as plantas apresentem formação de raiz e crescimento vegetativo. Esta verificação é feita por meio de inspeções visuais realizadas com frequência de 15 dias. As plantas aptas poderão ser transferidas definitivamente, a câmara de conservação de 10°C.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2016. (Série Biodiversidade; 44). p. 844-860.

MURASHIG, T.; SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

NICOLOSO, F. T.; CASSOL, F.; FORTUNATO, R. P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 57-60, 2001.

NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, R. P.; FOGAÇA, M. A. F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 277-283, 1999.

SILVA-JÚNIOR, A. A.; OSAIDA, C. C. Ginseng-brasileiro: novo estímulo para o campo e para o corpo. **Agropecuária Catarinense**, v. 18, n. 2, p. 41-44, 2005.

Referências

ALVES, R. B. N.; MENDES, R. A.; MENDES, M. A.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, D. B.; CARDOSO, L. D.; SALOMÃO, A. N.; VIEIRA, R. F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. esp., p. 1-4, 2006.

ALVES, R. B. N.; BERTONI, B. W.; VIEIRA, R. F.; FRANÇA, S. C.; MING, L. C.; PEREIRA, A. M. S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 510-515, 2010.

CORRÊA-JÚNIOR, C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G.; SCHEFFER, M. C.; KAMADA, T.; ALVES, R. de B. N. *Pfaffia glomerata*: ginseng-brasileiro. In:

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:
Exemplares desta publicação podem
ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Márlia Lobo Burle

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
*Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar
Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João
Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva;
Maria Cléria Valadares Inglis; Rosamares
Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Rosamares Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbêiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Patrícia Flores

CGPE 14985